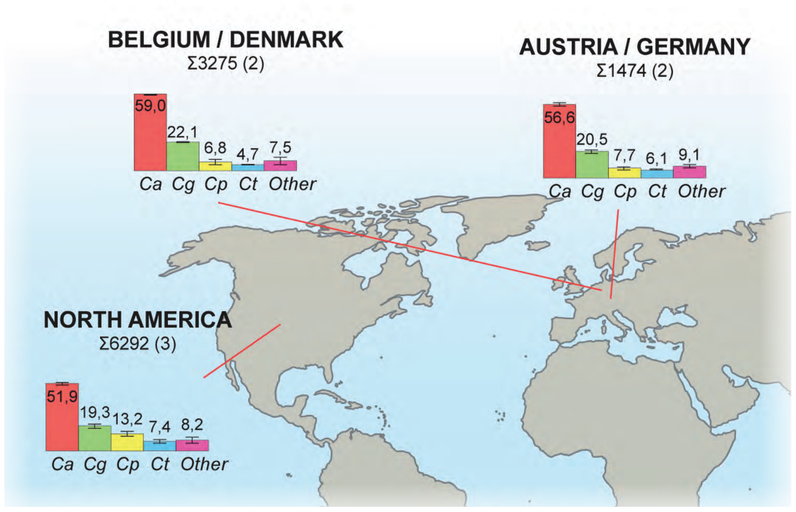
Eine genomweite Sammlung von Gendeletionsmutanten in *Candida glabrata*

Fabian Istel[1], Tobias Schwarzmüller[1], Walter Glaser[1], Birgit Willinger[2] & Karl Kuchler[1]

[1] Medical University Vienna, Max F. Perutz Laboratories, Campus Vienna Biocenter, Dr. Bohr-Gasse 9/2, A-1030 Vienna, AUSTRIA. Phone: +431-4277-61818; FAX: +431-4277-9618; e-mail: fabian.istel@meduniwien.ac.at
[2] Medical University Vienna, Klinische Abteilung für klinische Mikrobiologie, Währinger Gürtel 18-20/E 05, 1090 Vienna, AUSTRIA. Phone: +431-40400-5151

In den letzten Jahren ist die Inzidenz systemischer Pilzinfektionen bei immunsuprimierten Patienten stetig gestiegen. Diese Infektionen werden häufig von Pilzen der Gattung *Candida* ausgelöst und weisen eine hohe Mortalität auf. *Candida glabrata* (*C.g.*) ist momentan der zweithäufigste Erreger bei systemischen Candidosen und ist verantwortlich für 15 – 20 % dieser Infektionen. Die inherente Toleranz von *C.g.* gegenüber Azolen ist hierbei von besonderer Bedeutung, da Azole in der Therapie und Prophylaxe weit verbreitet sind. Interessanterweise ist *C.g.* aber nicht in der Lage Hyphen zu bilden oder Proteinasen zu sekretieren. In *Candida albicans* (*C.a.*) sind beides wichtige Fähigkeiten für dessen Virulenz. Diese Unterschiede zu *C.a.* und die inherente Toleranz gegenüber konventionellen antifungalen Therapien verdeutlichen die Notwendigkeit die Virulenzfaktoren von *C.g.* zu erforschen.
Um potentielle Virulenz- und Resistenzfaktoren zu identifizieren, haben wir mit der Erstellung einer Sammlung von Gendeletionsmutanten in *C.g.* begonnen. Mit Hilfe dieser Kollektion ist es möglich die Rolle bestimmter Gene für beispielsweise Virulenz und Resistenz zu untersuchen. Die über 700 Mutanten der Sammlung wurden umfangreich in vitro unter verschiedenen Stresskonditionen getestet. Diese umfassten unter anderem extreme Temperaturen, verschiedene pH-Werte, osmotischen sowie antifungalen Stress.
Um diesen großen Datensatz zu verifizieren, haben wir ausgewählte Gene ebenfalls in klinischen Isolaten deletiert. Diese klinischen Isolate weisen teilweise hohe Toleranzen gegenüber Echinocandinen, Azolen und Polyenen auf. Dadurch ist es möglich die Beiträge einzelner Gene zu antifungalen Resistenzen in der Klinik zu erforschen.

1 *C. glabrata* - Globale Verbreitung



Istel et al., in submission

Abbildung 1: *C. glabrata* (grün) ist nach *C. albicans* (rot) der zweithäufigste Auslöser von systemischen *Candida* Infektionen. Insbesondere in Nordamerika und vielen Teilen Europas ist C. glabrata für etwa 20 % dieser Infektionen verantwortlich und kommt damit noch vor *C. parapsilosis* (gelb) und *C. tropicalis* (blau). Dennoch ist über Virulenz- und Resistenzfaktoren von *C. glabrata* bisher nur wenig bekannt.

2 Gendeletionen in *C. glabrata*

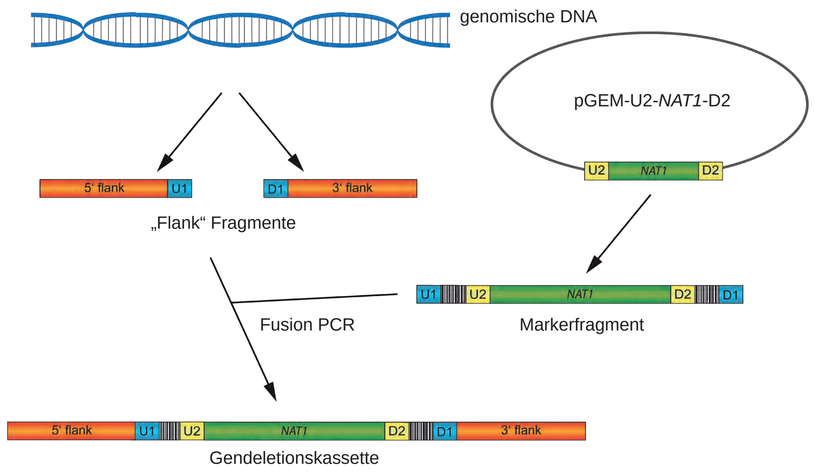
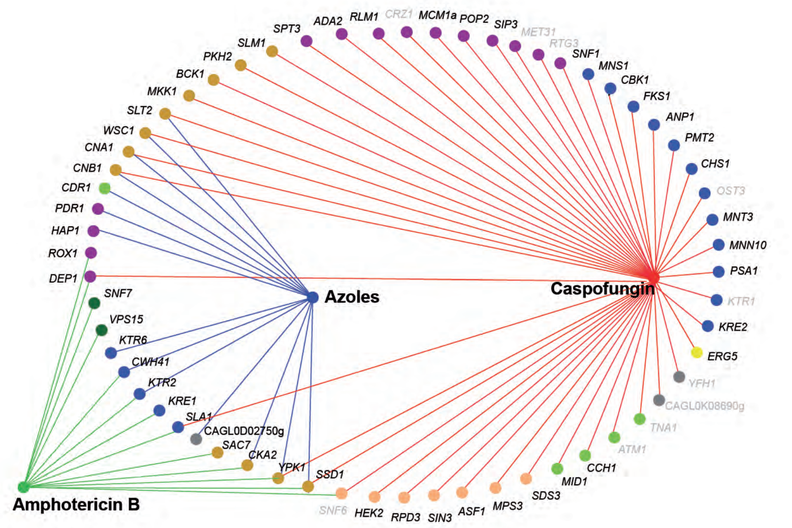


Abbildung 2: Die Gendeletionskassetten bestehen aus einem Markerfragment, sowie zwei „Flank" Fragmenten für die Reintegration in das Genom von *C. glabrata*. Dadurch ersetzt die Gendeletionskassette das zu deletierende Gen und ermöglicht durch den Marker das Wachstum auf Nourseothricin-supplementierten Platten. Durch eingebaute Barcodes können mehrere Stämme „gepoolt" werden und gemeinsam in einem Experiment eingesetzt werden.

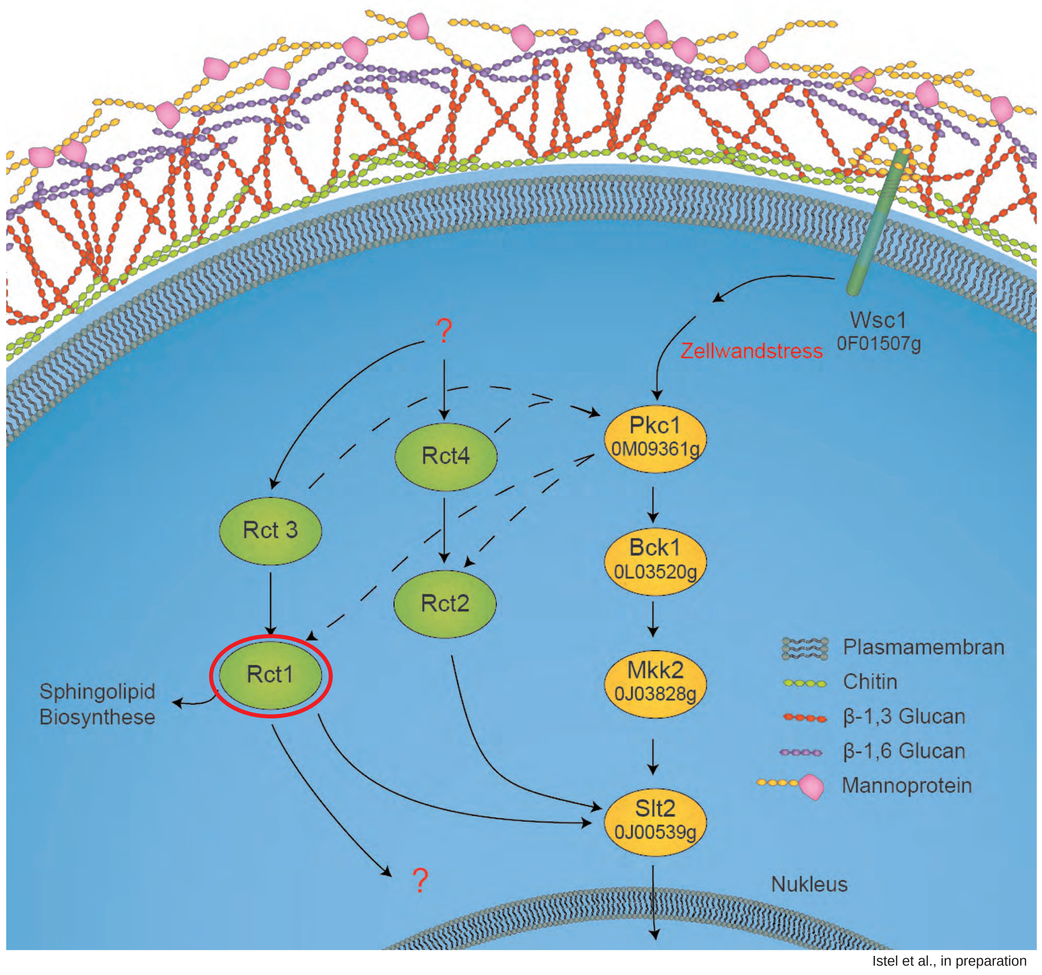
3 Sensitive Deletionsmutanten



Schwarzmüller et al., 2014

Abbildung 3: Die Deletionsmutanten wurden insbesondere auf antifungalen Stress getestet. Viele Mutanten zeigen erhöhte Sensitivität auf AmphotericinB (grün), Azole (blau) und Caspofungin (rot). Für 28 Gene wurde erstmalig gezeigt, dass sie eine Rolle für die Caspofungin-Toleranz von *C. glabrata* haben.

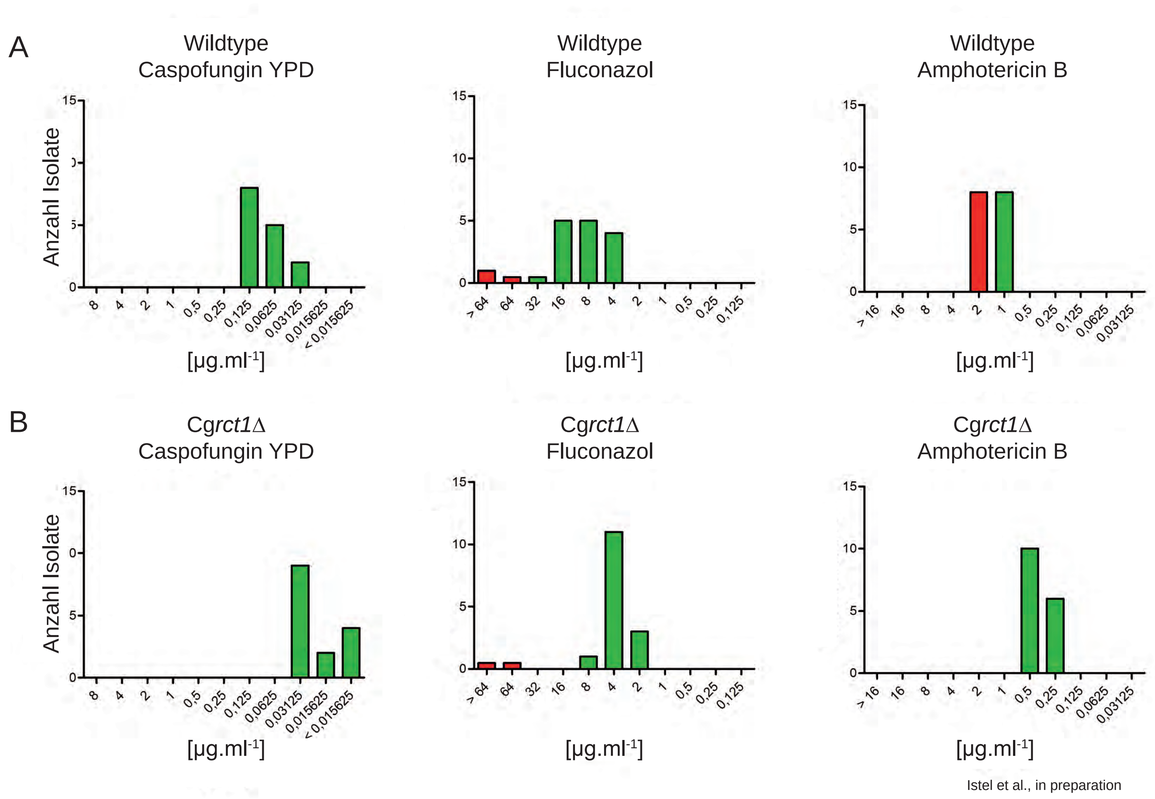
4 Antifungale Hypersensitivität durch Deletion einer Kinase



Istel et al., in preparation

Abbildung 4: Der Sensor Wsc1 detektiert Zellwandstress und aktiviert den „Cell wall integrity" Pfad (gelb), anschließend leiten die Kinasen dieses Pfades das Signal in den Zellkern weiter. Dieser Stress kann beispielsweise durch Caspofungin ausgelöst werden. Die Kinase Rct1, eines parallel dazu arbeitendes Netzwerks (grün), ist maßgeblich an der Caspofungin Toleranz von *C. glabrata* beteiligt. Die Deletion dieser Kinase führt zu Hypersensitivität gegenüber Caspofungin.

5 Nachweis in klinischen Isolaten



Istel et al., in preparation

Abbildung 5: Um die Rolle von *RCT1* bei der Toleranz gegenüber antifungalen Substanzen nachzuweisen wurde das Gen in 15 klinischen Isolaten von *C. glabrata* deletiert. Die MICs wurden nach der EUCAST Methode bestimmt und ausgewertet. Stämme deren MIC über den „Breaking points" liegen, sind rot dargestellt (für Caspofungin mangels „breaking point" nicht möglich). In Reihe A sind die MIC-Verteilungen der Wildtypen dargestellt, in Reihe B für die Deletionsmutanten der jeweiligen Wildtypen. Dabei zeigt sich, dass das Fehlen von *RCT1* eine Verschiebung der MICs zu geringeren Werten bewirkt.

This work was supported by the Austrian Science Foundation FWF through the ERA-Net Pathogenomics project FunPath to KK (FWF-API-0125) and in part by the Christian Doppler Society to KK.